

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, ИНДУКТОРА ЭКСПРЕССИИ ЭТИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Н.И. Соловьева, О.С. Тимошенко, Т.А. Гуреева, Е.В. Кугаевская

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича», Россия, Москва*

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинковых тканевых металлопротеиназ, для активности которых необходимы ионы кальция. Они выполняют как деструктивные так и регуляторные функции. ММП отвечают за метаболизм белков соединительно-тканного матрикса (СТМ). Охарактеризовано 25 ММП, которые основываясь на данных по субстратной специфичности и структурной организации, можно разделить на следующие подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, мембраносвязанные ММП и неклассифицированные ММП. ММП являются индуцируемыми протеиназами, активность которых в нормальных условиях находится на очень низком уровне или отсутствует. Большинство ММП относятся к секретируемым ферментам (кроме мембраносвязанных). В настоящее время ММП обнаружены и внутри клеток. Эти ферменты в совокупности способны гидролизовать все основные компоненты компоненты СТМ. Кроме того, они выполняют важные регуляторные функции активируя, инактивируя и модифицируя свойства целого ряда биологически активных молекул в том числе и не относящихся к СТМ, таких как плазмин, урокиназа, ингибиторы сериновых протеиназ, интерлейкины факторы роста и др. Особое место отводится ММП в развитии процессов инвазии и метастазирования опухолей. Тканевые коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13, ММП-14), наряду с желатиназами (ММП-2, ММП-9), играют решающую роль в развитии этих процессов, поскольку они специфически гидролизуют более 90% белков группы коллагена, которые составляют 25-30 % от общего количества белков в организме человека. Коллагеназы специфически гидролизуют фибриллярные коллагены I, II, III, V и IX типов, которые устойчивы к действию протеолитических ферментов. Они запускают гидролиз фибриллярных коллагенов, при этом специфически гидролизуют одну связь, находящуюся на расстоянии одной четвертой длины полипептидной цепи молекулы коллагена с С-конца. Продукты гидролиза способны денатурировать в физиологических условиях и подвергаться действию широкого спектра протеиназ, тем самым коллагеназы обеспечивают инициацию и развитие деструктивного процесса. Желатиназы гидролизуют коллаген IV типа – основу базальных мембран, тем самым обеспечивая развитие процессов инвазии и метастазирования. Этим двум группам ферментов принадлежит ключевая роль в разрушении соединительно-тканного барьера при развитии онкологического процесса. Кроме того эти ММП отвечают за образование целого ряда биологически активных молекул, участвующих в регуляции онкологического процесса таких как VEGF, EGF, PDGF, IGF, TNF α , TNF β , интегрин α V β 3, E-кадгерин, L- селектин и др.

ММП экспрессируются в виде про-ферментов. Их активация, происходит с помощью тканевых протеиназ. Основным активатором секретируемых про-ММП является

плазмин, а для мембраносвязанных про-ММП – фурин. Активность плазмина оценивают косвенно через активность активатора пламиногена урокиназного типа – уАП. Фурин активирует про-ММП в аппарате Гольджи. Активность ММП в тканях регулируется специфическими тканевыми ингибиторами – ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4. Они обладают избирательной специфичностью, однако могут ингибировать активность всех членов семейств ММП. В крови основным ингибитором ММП является α 2-макроглобулин.

Индуктор экспрессии матриксных металлопротеиназ - EMMPRIN (EMN) или кластер дифференцировки 147 (CD 147) относится к семейству иммуноглобулинов. Он является полифункциональным гликопротеином, который обнаружен в различных тканях и клетках. Установлено, что EMN экспрессируется на эпителиальных, эндотелиальных клетках, фибробластах, эритроцитах, тромбоцитах и др. клетках, а также в гипокампе, сердце, плаценте и др. тканях. Он участвует в развитии ряда патологий, таких как вирусные инфекции (ВИЧ и гепати В), ишемия, болезнь Альцгеймера и др. Особая роль отводится EMN в развитии онкологических процессов, поскольку на трансформированных клетках происходит его высокая экспрессия, которая ассоциируется с прогрессией онкологического процесса и плохой выживаемостью пациентов. EMN существует как в мембраносвязанной, так и в растворимой формах. Мембраносвязанная форма EMN отвечает за индукцию экспрессии ММП. На клеточном уровне было установлено, что экспрессия EMN промотирует не только экспрессию ММП, а также развитие таких процессов как пролиферация, миграция, инвазия и метастазирование и ангиогенез. Молекулярные механизмы этих процессов изучаются.

Наши исследования посвящены изучению особенностей экспрессии ММП, а именно коллагеназ, желатиназ и их эндогенных регуляторов при плоскоклеточной карциноме шейки матки (ПКШМ). Этиологическим фактором рака шейки матки являются вирусы папиллом (HPV) высокого риска. По статистике распределение основных генотипов HPV в России таково: HPV-16 – 64,4%, HPV-18 – 9,6%, HPV-45 – 7,9%. На долю остальных онкогенных типов HPV приходится порядка 17%. Рак шейки матки занимает второе место, после рака молочной железы, по частоте заболеваемости и смертности от рака у женщин. Установлено, что основными трансформирующими генами вирусов папиллом человека являются гены E6 и E7. У 90% больных раком шейки матки обнаруживаются транскрипты генов E6 и E7 в биопсийном материале. Продукты этих генов полифункциональны. Установлено, что они могут взаимодействовать с белками клеточных генов-супрессоров: p53 и продуктом гена ретинобластомы (Rb105). Однако их функциональный потенциал недостаточно изучен, тогда как изменение протеолитического потенциала при трансформации клеток этим вирусом может служить важным маркером злокачественности. Исследование особенностей экспрессии ММП при ПКШМ проводятся в основном на клеточных линиях и связаны с изучением инвазивного и метастатического потенциалов клеток. Работы на клиническом материале достаточно малочисленны, несмотря на то, что они позволяют оценить деструктивный потенциал опухолевой ткани, что может иметь прогностическое значение.

Наши основные результаты получены при изучении особенностей экспрессии ММП и их эндогенных регуляторов, а именно: экспрессии коллагеназ (ММП-1, ММП-14), желатиназ (ММП-2, ММП-9), их тканевых ингибиторов – ТИМП-1 и ТИМП-2, а также активатора про-ММП - уАП. Работа проведена на следующих объектах: 1. на фибробластах, трансформированных путем трансфекции гена E7 HPV-16 в интактные клетки; 2. на коммерческих линиях клеток, ассоциированных с HPV-16 и HPV-18; 3. на опухолевых образцах ПКШМ, ассоциированных с геном E7 HPV-16 и прилегающей к опухоли нормальной ткани; 4. на ткани тела матки от стенки влагалища до дна при ПКШМ. Подобный подход позволил оценить влияние гена E7 HPV-16 на трансформацию и потенциал ММП на уровне трансформации клеток и клеточных линий, полученных из опухолей пациентов при ПКШМ, а также на уровне опухолевых тканей организма при использовании клинического материала и оценить влияние ПКШМ на ткани всего органа матки. Исследования

проведены на генном и белковом уровне с использованием ОТ-ПЦР, зимографии, иммуногистохимических, иммуноферментативных, и энзимологических методов.

Получены следующие основные результаты:

1. Исследование экспрессии ММП в трансформированных (ТФ) и иммортализованных фибробластах (ИФ) показало: а) трансфекция фибробластов онкогеном E7 HPV16 сопровождалась индукцией экспрессии генов и активности коллагеназ – ММП-1, ММП-14 и желатиназы ММП-9, а экспрессия желатиназы ММП-2 существенно не изменялась; экспрессия ММП коррелировала с опухолевым потенциалом трансформированных клонов; б) экспрессия ММП-9 обнаружена только в ТФ; в) в ТФ происходило снижение экспрессии мРНК ингибитора коллагеназ TIMP-1 и увеличение экспрессии ингибитора желатиназ – TIMP-2; уровень свободных эндогенных ингибиторов в ТФ был значительно ниже их уровня в ИФ; г) в ИФ незначительно увеличивалась коллагенолитическая активность и экспрессия мРНК коллагеназы ММП-14, а активность желатиназ не изменялась. Результаты указывают на увеличение деструктивного потенциала ТФ за счет индукции экспрессии коллагеназ и желатиназы ММП-9 и снижения уровня ингибиторов ММП. ММП-9 может служить маркером ТФ.

2. Исследование экспрессии ММП на коммерческих клеточных линиях ПКШМ: SiHa и Caski, ассоциированных с HPV16, линиях Hela и C4-1, ассоциированных с HPV18, показало: а) инвазивный потенциал в линиях HPV18 более выражен, чем в линиях HPV16; б) экспрессия мРНК коллагеназ ММП-1, ММП-14, и активатора – uAP в большинстве линий клеток увеличивалась, в то время как экспрессия мРНК желатиназы ММП-2 и ингибиторов существенно не изменялась; в) активность ММП-2 в линиях Caski и Hela увеличивалась, что свидетельствует о нарушении конститутивной регуляции ММП-2; г) экспрессия секретируемой ММП-9 в линиях клеток не обнаружена; г) увеличение деструктивного потенциала в клеточных линиях происходило в основном за счет увеличения экспрессии коллагеназ и низкого уровня экспрессии ингибиторов.

3. Сравнительное исследование экспрессии ММП, проведенное на ассоциированных с E7 HPV16 образцах опухолей ПКШМ в присутствии или отсутствии метастазов, показало, что основной вклад в инвазивный и метастатический потенциалы опухолей вносит увеличение экспрессии коллагеназ ММП-1, ММП-14, желатиназы ММП-9 и снижение экспрессии ингибиторов TIMP-1 и TIMP-2, и в меньшей степени - увеличение экспрессии ММП-2. ММП-1 и ММП-9 могут служить маркерами инвазивного и метастатического потенциалов опухолей при ПКШМ.

4. В прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9, которая вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли.

5. Сравнительные исследования экспрессии ММП-1 и EMMPRIN, проведенные на тканевых «лентах» от стенки влагалища до дна полости матки при ПКШМ свидетельствуют о том, что экспрессия EMMPRIN в «лентах» может происходить на высоком уровне как в опухолевых, так и во фрагментах нормальной ткани матки. Экспрессия ММП-1 была существенно выше в опухолевых фрагментах и резко снижалась в нормальных фрагментах тела матки, где она находилась на достаточно низком уровне. Следует учесть, что, как правило, в тканях в норме экспрессия ММП практически отсутствует. Прямой корреляции между экспрессией EMMPRIN и ММП-1 не наблюдалось как в опухолевых, так и в «нормальных» фрагментах тканей.

Высокая экспрессия конститутивного фермента - ММП-2 и индуцируемого фермента - ММП-9 обнаружена не только в опухоли, но и в нормальной ткани матки. Экспрессия ММП-9 может индуцироваться в теле матки, где в нормальных условиях она отсутствует. ММП-9 может служить маркером инвазивного процесса. Нарушение регуляции экспрессии этих ферментов происходит не только на генном, но и на посттрансляционном уровне, о чем свидетельствуют данные по сниженной экспрессии TIMP-1 и TIMP-2, а повышенная экспрессия желатиназ направлена на развитие инвазивного потенциала

ПКШМ. Полученные данные указывают на различные функции ММП-2 и ММП-9 в тканях.

Данные, полученные на клиническом материале, согласуются с данными, полученными на линиях клеток и свидетельствуют о том, что основной вклад в деструктивный (инвазивный) и метастатический потенциалы ПКШМ вносят увеличение экспрессии ММП-1 и ММП-9 и низкая экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2, и в меньшей степени - увеличение экспрессии ММП-2. Экспрессия ММП-1 и ММП-9, которая особенно ярко выражена в метастазирующих опухолях, может служить маркером метастатического и инвазивного потенциалов опухоли. В прилегающей к опухоли нормальной ткани обнаружена экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9, которая вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли и является показателем неблагоприятного прогноза. В нормальной ткани тела матки при ПКШМ обнаружена высокая экспрессия EMMPRIN, индукция экспрессии ММП, что имеет значение для проведения соответствующей терапии, прогнозирования возможных рецидивов и терапевтического наблюдения за пациентом.

Полученные данные важны для понимания механизма деструктивного потенциала опухоли при ПКШМ; имеют прогностическое значение и могут использоваться для разработки фармакологических средств. ММП-1 и ММП-9 могут использоваться в качестве дополнительных маркеров инвазивного и метастатического потенциалов опухоли.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и при поддержке грантов РФФИ 07-04-01233 и 10-04-01573.